

III. BAHAN DAN METODE

3.1. Tempat dan waktu

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikologi jurusan Hama dan penyakit Tumbuhan dan rumah kawat Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya Malang, sejak bulan Agustus 2014 hingga bulan Desember 2014.

3.2. Alat dan bahan

Alat yang digunakan dalam pelaksanaan penelitian ini yaitu cawan petri, Preparat cembung, bunsen, jarum ose, pinset, gelas ukur, pelubang gabus, kuas, jarum, pipet tetes, sprayer, handcounter, botol media, autoclave, kompor listrik, kaca preparat, tabung reaksi, cover glass, mikroskop, gunting, wreeping, alumunium foil, centrifuge, Laminar Air Flow (LAF), mikroskop dengan, kamera, haemocytometer, penggaris, mikropipet, kotak plastik, kertas label.

Bahan yang digunakan yaitu isolat *Colletotrichum* sp., tanaman *Sansevieria*, Potato Dextrose Agar (PDA), alkohol 70%, aquades, Larutan Carnoy's, dan asam Laktat 50%.

3.3. Metode penelitian

Penelitian ini menggunakan metode eksplorasi tanaman *Sansevieria* yang bergejala antraknosa yang kemudian diisolasi ke media buatan PDA (Potato Dextrose Agar). Dari hasil biakan kemudian diidentifikasi secara makroskopis maupun mikroskopis. Jamur yang telah teridentifikasi kemudian dilakukan percobaan ke tanaman *Sansevieria* (inangnya) sesuai perlakuan dari metodologi. Percobaan menggunakan Rancangan Acak Lengkap pada skala laboratorium.

3.4. Persiapan bahan penelitian

3.4.1. Medium buatan PDA

Metode pembuatan media PDA, yaitu kentang yang telah dikupas dan dipotong kecil-kecil kemudian ditimbang sebanyak 250 gram, dicuci kembali, dan direbus dengan 800 ml aquades. Setelah kentang menjadi lunak selanjutnya kentang ditiriskan dan disisakan sarinya. Kemudian melarutkan 20 gram agar dan 20 gram dekstros dalam 200 ml aquades. Selanjutnya mencampur sari kentang dengan larutan agar dan dekstros, larutan tersebut kemudian dipanaskan hingga

mendidih dan diaduk agar tidak menggumpal dan ditambahkan 1 kapsul klorampenikol, hal ini bertujuan untuk mencegah timbulnya kontaminasi bakteri. Setelah itu media dimasukkan ke dalam botol media dan ditutup menggunakan kapas serta aluminium foil, kemudian disterilisasi dengan autoklaf. Setelah selesai sterilisasi kemudian media diplating ke cawan petri.

3.4.2. Isolasi jamur patogen pada tanaman *Sansevieria trifasciata*

Tanaman *S. trifasciata* yang menunjukkan gejala antraknosa yang didapat dari taman daerah Malang. Pada jaringan daun yang terinfeksi dipotong kecil dengan ukuran 1 cm dengan potongan yang mengandung jaringan sakit dan jaringan sehat. Potongan tersebut disterilisasi dengan alkohol 70 % selama 1 – 2 menit untuk membersihkan kontaminasi di permukaan jaringan. Kemudian potongan tersebut dibilas dengan air destilasi steril sebanyak 2 kali pembilasan yang kemudian dikering anginkan di atas tisu steril. Potongan tersebut kemudian ditanam pada media PDA yang telah disiapkan sebagai media tumbuh dan perkembangbiakan koloni jamur. Koloni yang tumbuh kemudian dipindahkan ke media PDA baru secara aseptik sampai mendapatkan biakan murni.

3.5. Pelaksanaan penelitian

3.5.1. Identifikasi jamur hasil biakan murni

Identifikasi secara morfologi dilakukan berdasarkan pengamatan makroskopis dan mikroskopis. Pengamatan mikroskopis dengan cara mengambil sedikit bagian PDA dan diletakkan di atas kaca preparat, kemudian sedikit jamur diambil dari media biakan dan diinokulasi ke *object glass* dan ditutup menggunakan cover glass. Inkubasi dilakukan selama 2 – 3 hari dengan menempatkan preparat di wadah yang telah dialasi tisu basah steril, pengamatan menggunakan mikroskop dengan perbesaran 400x. Identifikasi mengacu menurut buku identifikasi, yaitu *Illustrated Genera of imperfect fungi* (Barnett dan Hunter, 1972) yang menunjukkan ciri jamur patogen tersebut.

3.5.2. Penyiapan inokulum

Inokulum diperoleh dari 5 plong koloni jamur yang kemudian di inkubasi terlebih dahulu didalam cawan petri yang didalamnya terdapat tisu atau kasa yang dibasahi dengan aquades selama lebih kurang 1 minggu. Setelah muncul massa konidia, plong koloni dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 5 ml air destilasi steril dan ditambahkan 1 tetes tween 80 bertujuan untuk melepas massa konidia yang menggumpal. Tabung reaksi digojog menggunakan centrifuse dengan kecepatan 3500 rpm selama 5 menit untuk melepas konidia jamur. perhitungan kerapatan konidia menggunakan haemocytometer tiap percobaan.

Pada percobaan I (perkecambahan) perhitungan kerapatan konidia dari 5 ml air destilasi + konidia ditambahkan 15 ml air destilasi, kerapatan dihitung dengan haemocytometer diperoleh sebagai berikut:

- Inokulum untuk percobaan I

Volume 1 kotak pada haemocytometer : 0,00025 mm³
 Jumlah kotak yang diamati : 5
 Jadi volume 5 kotak : 5 x 0,00025 mm³
 : 1,25 x 10⁻³ mm³

Jumlah konidia dalam :

Kotak I	: 3
Kotak II	: 1
Kotak III	: 1
Kotak IV	: 1
Kotak V	: 2
<hr/>	
Total	: 8

Konsentrasi suspensi = $\frac{8 \text{ konidia}}{1,25 \times 10^{-3} \text{ mm}^3} = \frac{8.000 \text{ konidia}}{1,25 \text{ mm}^3}$
 = 6 x 10³ konidia / cm³

Sehingga kerapatan yang digunakan untuk melihat perkecambahan konidia adalah 6 x 10³ konidia / cm³.

Pada percobaan II (metode inokulasi) perhitungan kerapatan konidia dari 5 ml air destilasi + konidia ditambahkan 25 ml air destilasi dan dimasukkan ke botol semprot, kerapatan dihitung dengan haemocytometer diperoleh sebagai berikut:

- Inokulum untuk percobaan II

Volume 1 kotak pada haemocytometer	: 0,00025 mm ³
Jumlah kotak yang diamati	: 5
Jadi volume 5 kotak	: 5 x 0,00025 mm ³
	: 1,25 x 10 ⁻³ mm ³

Jumlah konidia dalam :	Kotak I	: 2
	Kotak II	: 1
	Kotak III	: 3
	Kotak IV	: 1
	Kotak V	: 3
	Total	: 10

$$\text{Konsentrasi suspensi} = \frac{10 \text{ konidia}}{1,25 \times 10^{-3} \text{ mm}^3} = \frac{10.000 \text{ konidia}}{1,25 \text{ mm}^3}$$

$$= 8 \times 10^3 \text{ konidia / cm}^3$$

Sehingga kerapatan yang digunakan untuk percobaan II cara inokulasi adalah 8×10^3 konidia / cm³.

3.5.3. Percobaan I

Percobaan dilakukan untuk mengetahui persentase perkecambahan, pembentukan apresoria konidia jamur *Colletotrichum* sp. yang ditetaskan pada permukaan daun lima jenis *Sansevieria* menggunakan pipet mikro.

Tabel 3.1. Perlakuan percobaan I

Perlakuan	Keterangan jenis
S-a	<i>Sansevieria trifasciata</i> var Laurentii
S-b	<i>Sansevieria trifasciata</i> var Golden hahnii
S-c	<i>Sansevieria trifasciata</i> var Moonshine
S-d	<i>Sansevieria trifasciata</i> var Hahnii
S-e	<i>Sansevieria hyacinthoides</i>

Data perkecambahan jamur *Colletotrichum* sp. diperoleh dengan bantuan *hand counter* yaitu dengan menghitung jumlah total konidia yang berkecambah dalam satu bidang pandang. Konidia dikatakan berkecambah apabila telah

membentuk tabung kecambah. Pengamatan dilakukan setiap 3 jam sekali (3, 6, 12, 18, 24, dan 48 jam). Masing-masing perlakuan diulang sebanyak 5 kali setiap perlakuan. Pembuatan preparat jaringan tanaman dengan cara mengambil lapisan epidermis menggunakan cutter atau silet setipis mungkin diletakkan diatas objek glass yang kemudian ditetesi dengan larutan laktofenol cotten blue dan ditutup dengan *cover glass* yang berfungsi sebagai pewarnaan jaringan tanaman, agar konidia yang diamati terlihat jelas (Sastrahidayat, 2014). Setelah pembuatan preparat awetan, perkecambahan diamati dibawah mikroskop dengan perbesaran 400x. Jumlah konidia berkecambah maupun belum berkecambah dihitung dengan *hand counter* dalam satu bidang pandang.

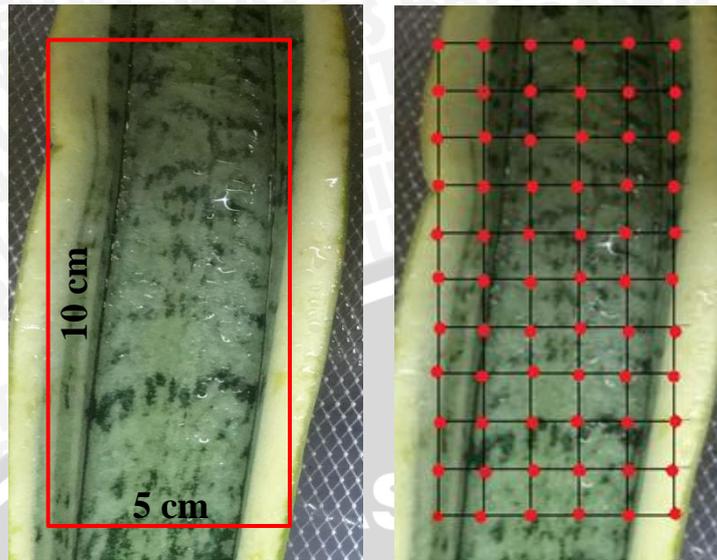
3.5.4. Percobaan II

Percobaan dilakukan untuk mengetahui masa inkubasi dari berbagai cara inokulasi, jumlah bercak yang muncul, dan lebar bercak, dan kejadian penyakit. Perlakuan percobaan dapat dilihat sebagai berikut (Tabel 3.1).

Tabel 3.2. Perlakuan percobaan II

Perlakuan	Keterangan inokulasi
Kontrol (a)	Daun <i>Sansevieria</i> diseprot dengan aquades
Semprot (b)	Inokulasi konidia dengan di semprot
Kuas (c)	Inokulasi konidia dengan di kuas
Tusuk + semprot (d)	Inokulasi konidia dengan ditusuk (Pelukaan) kemudian disemprot

Percobaan dilakukan di laboratorium menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang diulang sebanyak 6 kali. Sebelum dilakukan perlakuan, *Sansevieria* yang telah dipilih kualitasnya dengan kriteria sehat dibersihkan terdahulu dengan pencucian di air mengalir kemudian dikeringkan dengan tisu steril kemudian dipotong sepanjang 20 cm dan digambar petak inokulasi seluas 5 cm x 10 cm (Gambar 3.1.). Tempat percobaan berupa kotak dengan diberi alas kawat yang dibawahnya diberi tisu yang dibasahi untuk memberikan kondisi lembab. *Sansevieria* ditata tiap perlakuan pada masing-masing kotak percobaan. Suspensi diinokulasi dengan cara semprot, kuas, dan tusuk semprot (pelukaan), inokulasi ditempatkan pada petak inokulasi yang telah digambar sebelumnya.



Gambar 3.1. Petak inokulasi berukuran 5 cm x 10 cm

3.5.5. Parameter pengamatan

Adapun parameter pengamatan dalam melakukan penelitian ini adalah:

a. Penampakan makroskopis jamur

Pengamatan makroskopis meliputi warna permukaan koloni, warna dasar koloni, tekstur koloni, bentuk koloni dalam cawan petri (konsentris atau tidak konsentris), dan pertumbuhan koloni (cm/hari). Pengamatan makroskopis dilakukan setiap hari hingga koloni jamur memenuhi cawan petri (diameter 9 cm).

b. Pengamatan mikroskopis jamur

Pembuatan preparat jamur bertujuan untuk mengamati bentuk jamur tersebut. Pengamatan mikroskopis meliputi hifa (bersekat atau tidak bersekat), pertumbuhan hifa (bercabang atau tidak bercabang), warna hifa (gelap atau hialin), warna konidia (gelap atau hialin), ada tidaknya konidia bentuk dan bentuk konidia (bulat, lonjong, berantai, atau tidak beraturan).

c. Percobaan I

Pada percobaan I peubah yang diamati adalah persentase perkecambahan dan persentase pembentukan apressorium pada masing-masing perlakuan dengan interval pengamatan yakni 3, 6, 12, 18, 24, dan 48 jam dibawah mikroskop dalam satu bidang pandang dibantu dengan *hand counter*.

- Persentase perkecambahan dihitung dengan menggunakan rumus:

$$PK = \frac{C}{K} \times 100\%$$

Keterangan:

PK = persentase perkecambahan,

C = jumlah konidia yang berkecambah, dan

K = jumlah konidia yang diamati (satu bidang pandang).

- Persentase pembentukan apresorium dihitung dengan menggunakan rumus:

$$PA = \frac{A}{C} \times 100\%$$

Keterangan:

PA = persentase pembentukan apresoria,

A = jumlah konidia yang berkecambah dan membentuk apresoria, dan

C = jumlah konidia berkecambah (satu bidang pandang).

d. Percobaan II

Pada percobaan II peubah yang diamati adalah masa inkubasi, jumlah bercak infeksi yang muncul, perkembangan bercak, dan kejadian penyakit. Masa inkubasi penyakit dihitung dengan cara mencatat hari pada saat munculnya gejala penyakit pada daun setelah inokulasi. Jumlah bercak dihitung secara manual dengan cara melihat kenampakan gejala akibat infeksi patogen, dan perkembangan bercak dihitung dengan mengukur dan diameter bercak ke dalam sentimeter menggunakan penggaris.

Untuk kejadian penyakit menggunakan rumus Sinaga (2003) sebagai berikut:

$$P = \frac{a}{N} \times 100\%$$

Keterangan:

P = kejadian Penyakit

a = jumlah bercak yang muncul pada petak inokulasi

N = luasan petak inokulasi

Laju infeksi (r) masing-masing diukur berdasarkan model persamaan menurut Van der Plank (1963) sebagai berikut:

$$r = \frac{1}{t_2 - t_1} + (\text{logit } x_2 - \text{logit } x_1)$$

Keterangan:

r	= Laju infeksi
x_1	= Kejadian penyakit pada t_1
x_2	= Kejadian penyakit pada t_2
t_1	= Pengamatan kejadian penyakit awal
t_2	= Pengamatan kejadian penyakit selanjutnya

3.5.6. Postulat Koch

Teknik Postulat Koch meliputi empat tahapan, yaitu Asosiasi, Isolasi, inokulasi dan reisolasi. (1) Asosiasi yaitu tahapan menemukan gejala penyakit dengan tanda atau gejala patogen pada tanaman inang. (2) Isolasi yaitu tahapan membuat biakan murni patogen pada media, sebagai contoh PDA (Potato Dextrose Agar). (3) Inokulasi yaitu tahapan penularan penyakit pada tanaman sehat dengan harapan mendapatkan gejala yang sama pada tahap asosiasi. (4) Reisolasi yaitu mengisolasi kembali patogen hasil dari inokulasi untuk memperoleh biakan yang sama dengan tahap isolasi.

Postulat Koch adalah metode untuk memastikan tentang kebenaran suatu patogen. Penularan patogen dengan cara penempelan media biakan pada daun *Sansevieria*, gejala yang muncul kemudian di reisolasi ke dalam medium buatan untuk melihat penampakan makroskopis dan mikroskopisnya untuk memastikan bahwa patogen tersebut benar sebagai patogen target. Perbandingan hasil isolasi dengan reisolasi, apabila menunjukkan kemiripan berarti patogen tersebut merupakan penyebab penyakit pada tanaman *Sansevieria*.

3.6. Analisis data

Data yang diperoleh yaitu masa inkubasi dibandingkan secara deskriptif, sedangkan data persentase perkecambahan, persentase pembentukan apressorium, perkembangan bercak (jumlah dan lebar bercak) dianalisis menggunakan Rancangan Acak Lengkap pada taraf 5% bila terdapat perbedaan yang nyata, analisis dilanjutkan menggunakan uji Beda Nyata Terkecil.